

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

海洋天然藥物開發研究—海洋天然藥物開發研究 (總計畫)

Exploration of Marine Natural Products in the Drug Development (General)

計畫編號：NSC 89-2323-B-002-013

執行期限：89年8月1日至90年7月31日

主持人：周宏農 國立臺灣大學 漁業科學研究所

計畫參與人員：盧重光 國立臺灣大學 海洋研究所

一、中文摘要

已建有 149 株微細藻株的單株培養，其中包括分屬 11 種不同之 25 株紅藻絲狀體、分屬 8 屬 29 種以上之 87 株渦鞭毛藻，分屬 7 屬 8 種以上之 37 株藍綠藻與 1 株定鞭藻。在已送測癌細胞活性的 113 株藻樣的正丁醇、氯仿及正己烷共 589 件的萃取出液，在 267 件對鼻咽癌 HONE-1 細胞的測試得到 43 件樣品具有大於 90% 的毒性，而在 322 件對胃癌 NUGC-3 細胞的測試中則獲有 47 件強毒樣品。利用微囊藻毒 MCYST-LR 所建立磷酸水解酵素抑制性分析於微藻萃出分液的活性測試，顯示 132 個藻株分液中有 5 件具有 >90% 強度的磷酸水解酵素抑制活性。本研究主要指出渦鞭毛藻中的 *Amphidinium* 和 *Prorocentrum* 的氯仿與正丁醇的萃出具有絕對多數之細胞毒性，部份種類的 *Alexandrium minutum* 與 *Prorocentrum lima* 的正己烷層亦具備癌細胞毒性。

關鍵詞：渦鞭毛藻、細胞毒性、原甲藻、前溝藻、微小亞歷山大藻

Abstract

One hundred and forty-nine clones of microalgal culture have been established in this research, which includes 25 clones of red algal filaments of 11 different species, 87 dinoflagellate clones of more than 29 species, 37 cyanophycean clones of 8 different species and one *Prymnesium* species. Among them, 113 clones have been tested of their hexane, chloroform and butanol extracts against the

cancer cell lines, HONE-1 and NUGC-3. It was observed that 43 of 267 extracts showed 90% cytotoxicity against HONE-1 and 47 of 322 extracts against NUGC-3. Conditions for the *in vitro* phosphatase inhibition assay has been optimized and applied for the assays of above microalgal extracts. Five of 132 extracts showed more than 90% inhibition activity on phosphatase function. First year result has revealed that the chloroform and butanol extracts of most of the *Prorocentrum* and *Amphidinium* species are cytotoxic. Hexane extracts of some of the *Alexandrium minutum* and *Prorocentrum lima* clones showed cytotoxicity.

Keywords: dinoflagellate, cytotoxicity, *Prorocentrum*, *Amphidinium*, *Alexandrium minutum*,

二、緣由與目的

本計畫為「海洋天然藥物開發研究」中三項子計畫中之一項，配合目標導向之「製藥與生物技術國家型計畫」研究工作的推展，開發具有臨床使用價值之新海洋藥物，以海洋微細藻類為材料進行抗癌及抗病毒藥物開發的研究。由台灣高度歧異的海洋環境中單離出不同分類別的微細藻，進行自動化高速藥物篩選，建立活性海洋微細藻種源庫，以提供多樣、穩定且可預期的樣品作為海洋活性天然物的研究基礎，研究初期分為二階段分別完成 25 種 100 藻株的篩選。

本研究所採取的策略與方法，為在藻粗萃物經自動化高速藥物篩選出具有顯著抗癌及抗病毒活性的藻株後，立即進行大

量培養以提供充裕的生物量，方便後續進行生物活性指引的分離純化，包括溶液分離、層析製備、質譜、核磁共振光譜等解析與化學分析或晶體結構解析，最終完成活性化合物之化學結構，期待三年內得以從本上海洋微細藻類中獲得約有二十個具有顯著活性之化合物並完成構造解析，作為抗癌及抗病毒等新藥物開發之化學合成、藥物作用機制及藥物動力的基礎。

三、結果與討論

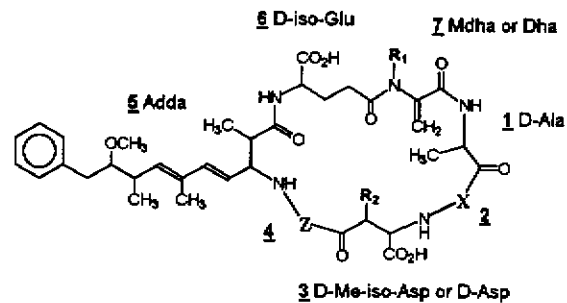
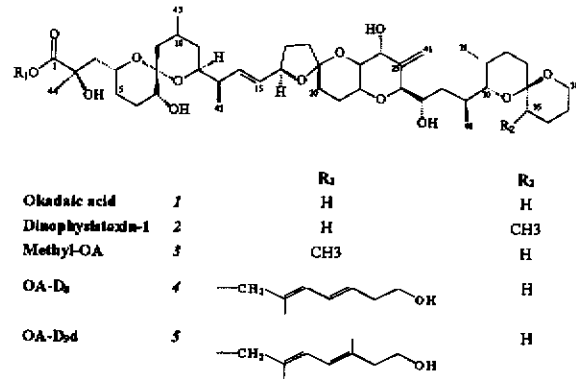
從已建有 149 株微細藻株的培養：包括 87 株分屬 8 屬 29 種以上渦鞭毛藻種，37 株分屬 7 屬 8 種以上藍綠藻與 1 株定鞭藻及 25 株分屬 11 種不同之紅藻絲狀體，獲得正丁醇、氯仿及正己烷的萃取分液分別送測細胞活性。在送測的 113 株藻樣，共 589 件分析中，267 件樣品中的 43 件對 HONE-1 有大於 90% 毒性，在 NUGC-3 則為 47/322。另外從 132 個藻株分液獲有 5 件具有磷酸水解酵素的抑制活性(>90%)。所得的結果如下表一所示：確認了底棲渦鞭毛藻中的 *Amphidinium* 和 *Prorocentrum* 的氯仿與正丁醇的萃出具有絕對多數之細胞毒性，部份能產讀得浮游種 *Alexandrium minutum* 與底棲的 *Prorocentrum lima* 的正己烷層亦具備癌細胞毒性，此與造成水產品中毒的毒素成份無關。

表一：本年度送測癌細胞株毒性分析之各藻株樣品統計表。

萃出溶液	微細藻類	癌細胞株毒性 ¹⁾				磷酸酵素抑制活性 ²⁾	
		HONE-1		NUGC-3			
		<10%	<50%	<10%	<50%	<10%	<50%
正己烷	渦鞭毛藻 (84) ³⁾	7/58 ⁴⁾	7/58	7/76	8/76	0/43	9/43
	藍綠藻 (19)	0/19	0/19	0/19	0/19	0/0	0/0
	藻類 (1)	1/1	1/1	1/1	1/1	0/1	0/1
	紅藻絲狀體 (8)	0/8	0/8	0/8	0/8	0/2	2/2
	總數 (112)	8/86	8/86	8/104	9/104	0/46	11/46
氯仿	渦鞭毛藻 (84)	19/62	19/62	18/80	21/80	1/40	13/40
	藍綠藻 (19)	0/19	0/19	0/19	0/19	0/0	0/0
	定鞭藻 (1)	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0
	藻類 (1)	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0
	紅藻絲狀體 (8)	0/8	0/8	0/8	0/8	2/2	2/2
總數 (113)	19/91	19/91	18/109	21/109	3/42	15/42	
正丁醇	渦鞭毛藻 (84)	17/61	20/61	17/80	18/80	2/42	12/42
	藍綠藻 (19)	0/19	0/19	0/19	0/19	0/0	0/0
	定鞭藻 (1)	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0
	藻類 (1)	0/1	0/1	0/1	0/1	0/0	0/0
	紅藻絲狀體 (8)	0/8	0/8	0/8	0/8	0/2	2/2
總數 (113)	17/90	20/90	17/109	18/109	2/44	14/44	
水	渦鞭毛藻 (21)	0/0	0/0	0/20	0/20	0/0	0/0
	總數 (21)	0/0	0/0	0/20	0/20	0/0	0/0
總比率		44/267	47/267	43/322	48/322	5/132	40/132

- ¹⁾ 癌細胞株毒性分別針對人類鼻咽癌細胞株 HONE-1 與胃癌細胞株 NUGC-3 測試，百分比表示 24 小時 50 μ g/ml 的樣品測試後細胞殘存少於 10% 或少於 50%。
- ²⁾ 磷酸酵素抑制活性以 Protein phosphatase-1 對 p-NPP 作用的產物在 405nm 的吸光為依據，百分比表示在統一的樣品測試濃度 1.2 μ g/well 下，於一小時酵素反應下產物吸光值對處於控制組的比值。
- ³⁾ 括弧內表示不受測試藻株之總數。
- ⁴⁾ 分子為具活性之藻株數，分母表示該項測試之藻株萃出物總數。

本計畫中從 *Prorocentrum lima* 共獲得的純質化合物計有 okadaic acid (OA) 1, dinophysistoxin-1 (DTX-1) 2 及一系列 okadaic acid 的 diol esters, 包括 Methyl-OA 3, OA-D8 4, OA-D9d 5 等, 以及微囊藻毒 MCYST-LR 6, MCYST-RR 7, MCYST-FR 8, MCYST-WR 9, [Dha]MCYST-LR 10, [Dha]MCYST-RR 11。這兩群的部份化合物均送測 HONE-1 與 NUGC-3 的活性。雖然這兩群不同結構之化合物同具磷酸酵素活性之抑制性, 但在細胞毒性之測試上卻呈現迥然不同之結果(表二), OA 與 DTX-1 具細胞毒性而 MCYSTs 則否, 這差異可能來自其溶解度上的不同或是本身在磷酸酵素上的抑制作用不同, 有待進一步探討。



Microcystin	R ₁	R ₂	X	Z
MCYST-LR 6	CH ₃	CH ₃	L-Leu	L-Ala
MCYST-RR 7	CH ₃	CH ₃	L-Arg	L-Ala
MCYST-FR 8	CH ₃	CH ₃	L-Phe	L-Ala
MCYST-WR 9	CH ₃	CH ₃	L-Trp	L-Ala
[Dha]MCYST-LR 10	H	CH ₃	L-Leu	L-Ala
[Dha]MCYST-RR 11	H	CH ₃	L-Arg	L-Ala
MCYST-YR 12	CH ₃	CH ₃	L-Tyr	L-Ala
[D-Asp]MCYST-FR 13	CH ₃	H	L-Phe	L-Ala
[D-Asp]MCYST-WR 14	CH ₃	H	L-Trp	L-Ala
MCYST-RA 15	CH ₃	CH ₃	L-Arg	L-Ala

表二：同具磷酸酵素活性抑制之兩類型毒性化合物純在在細胞毒性分析上的結果。

純質化合物名稱	編號	HONE-1		NUGC-3	
		10 μ M	50 μ M	10 μ M	50 μ M
Okadaic acid	1	-1%	3%	5%	3%
DTX-1	2	8%	4%	18%	2%
MCYST-LR	6	183%	181%	183%	184%
MCYST-RR	7	99%	93%	100%	100%
MCYST-FR	8	99%	99%	95%	100%
MCYST-WR	9	183%	187%	181%	183%
[Dha]MCYST-LR	10	184%	183%	183%	98%
[Dha]MCYST-RR	11	183%	100%	99%	104%

由於微細藻類不同族群與種株間的生化特性差異大，且因單細胞無分化之儲藏器官，活性成份含量少，再則生質量之獲得不容易，特別是微細藻須經細胞單離、培養、生長條件測試以至於大量培養，方有足夠之生質量以供化合物之提純。加以其活性物質分子大小均較一般為大，在核磁共振光譜上之訊號又多重疊，其結構解析較為複雜困難，自不能相較於其他生物之天然物之提純與結構解析之進度。

在研究人力上，由於具有同時具備包括細胞單離、培養、生長條件測試、大量培養以至於微量化合物提純、結構解析等執行研究工作能力之博士後或碩士後人力難覓或需長期訓練，分工執行又礙於研究經費的限制、致使工作進度非如自我之期許，是本計畫工作執行中遭遇的最大困擾。此乃工作之難度而非在人員之不夠努力。

由於每樣生物樣品當育成時所能獲得之生質量足以因應更多於抗癌抗病毒活性的篩選，但目前粗萃液或純質之測試僅止於 NUGC-3 與 HONE-1 細胞株的活性測試，可能遺漏其他可能藥物開發之活性成份，建議若能在其他活性分析上能持續發展擴大或舉辦研習會傳授不同領域之活性篩檢模式，方便化學提純研究單位能夠在提純過程中能夠同步篩檢，應是一項有效應用現有資源的發展策略。

四、計畫成果自評

計畫執行期間有其外在條件的困難度，原本規劃中欲達到目標，包括種原庫的建立與收集目標均已達成原計畫之預期

進度。但在核准的金額與人力規模上，自我評鑑的結論是盡其在我而努力有加，在整個微細藻活性成份的分布成果來看，披露出出渦鞭毛藻的多種活性物質存在，包括老鼠與豐年蝦的毒性，以及其在食物鏈與生態環境中扮演的角色。從 2000 年八月一日開始至今的成果，可說是豐碩，惟在人力上若能有更多的配合，當有更多活性物質的被提純及結構鑑定。微細藻的資源，有賴於培養與保種技術，在本計畫的支援下，藻種庫內涵的不斷擴張以及培養技術的改進，具備無限開發的潛力，也保障活性物質在外來藥物開發時，材料的不絕供應。

五、參考文獻

- Murray H.G., Blunt J.W., Dumdei E.J., Hickford S.J.H., Lill R.E., Li S.C., Christopher N. and Duckworth A.R., 1999, *J. of Biotech.* 70: 15-25.
- Kobayashi, J.-I., and Ishibashi, M., 1993, *Chem. Rev.* 93: 1753-1769.
- Murakami Y., Oshima Y., and Yasumoto T., 1982, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 48: 69-72.
- Nakajima I., Oshima Y. and Yasumoto T., 1981, *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fish.* 47: 1029-1033.
- Ishibashi M. and Kobayashi J.-I., 1997, *Heterocycles* 44: 543-572.
- Tsuda M., Endo T. and Kobayashi J.-I., 1999, *Tetrahedron* 55: 14565-14570.
- Kubota T., Tsuda M. and Kobayashi J.-I., 2000, *Tetrahedron Letters* 41: 713-716.
- Tsuda M., Endo T. and Kobayashi J.-I., 2000, *J. Org. Chem.* 65: 1349-1352.
- Bauer I., Maranda L. Young K. A. and Shimizu Y., 1995, *J. Org. Chem.* 60: 1084-1086.
- Shimizu Y., 1996, *Annu. Rev. Microbiol.* 50: 431-465.
- Shimizu Y., 1993, *Chem. Rev.* 93: 1685-1698.